

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年10月15日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-354930
[ST. 10/C]: [JP2003-354930]

出 願 人
Applicant(s): 第一化学薬品株式会社
株式会社東京大学 TLO

REC'D 09 DEC 2004

WIPO

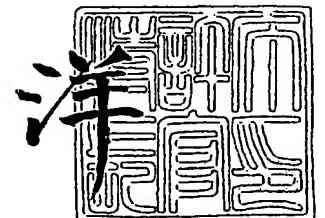
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P04671510
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台 3 - 3 - 1 第一化学薬品株式会社診断薬
研究所内
【氏名】 海老沼 宏幸
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台 3 - 3 - 1 第一化学薬品株式会社診断薬
研究所内
【氏名】 矢後 弘和
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県龍ヶ崎市向陽台 3 - 3 - 1 第一化学薬品株式会社診断薬
研究所内
【氏名】 秋元 優夏
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社診断薬
研究所内
【氏名】 宮崎 修
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区本郷 7 - 3 - 1 東京大学大学院医学系研究科内
【氏名】 門脇 孝
【発明者】
【住所又は居所】 東京都文京区本郷 7 - 3 - 1 東京大学大学院医学系研究科内
【氏名】 山内 敏正
【特許出願人】
【識別番号】 390037327
【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社
【特許出願人】
【識別番号】 503181716
【氏名又は名称】 門脇 孝
【代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 中嶋 俊夫
【選任した代理人】
【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸
【選任した代理人】
【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄
【選任した代理人】
【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100089048
【弁理士】
【氏名又は名称】 浅野 康隆
【選任した代理人】
【識別番号】 100101317
【弁理士】
【氏名又は名称】 的場 ひろみ
【選任した代理人】
【識別番号】 100117156
【弁理士】
【氏名又は名称】 村田 正樹
【選任した代理人】
【識別番号】 100111028
【弁理士】
【氏名又は名称】 山本 博人
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 164232
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

下記の 3 種のアディポネクチンのうちの 1 種又は 2 種を、プロテアーゼ及び／又は抗体を使用して、他のアディポネクチンと分別して免疫学的に測定することを特徴とする、生体試料中のアディポネクチンの測定方法。

(1) LMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、150 kDa 以上 200 kDa 以下であり、アルブミンがジスルフィド結合しているアディポネクチン。

(2) MMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、200 kDa 超 400 kDa 未満であるアディポネクチン。

(3) HMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、400 kDa 以上 800 kDa 以下であるアディポネクチン。

【請求項 2】

LMW-Ad が、さらに、血清をポリアクリルアミドゲル (2-15%) で電気泳動し、抗アディポネクチン抗体を用いてウェスタンブロット染色した場合、主要な染色バンドとして検出される 3 種のバンドのうち、最も低分子量の位置で検出されるアディポネクチンである、請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 3】

MMW-Ad が、さらに、血清をポリアクリルアミドゲル (2-15%) で電気泳動し、抗アディポネクチン抗体を用いてウェスタンブロット染色した場合、主要な染色バンドとして検出される 3 種のバンドのうち、中間の分子量の位置で検出されるアディポネクチンである、請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 4】

HMW-Ad が、さらに、血清をポリアクリルアミドゲル (2-15%) で電気泳動し、抗アディポネクチン抗体を用いてウェスタンブロット染色した場合、主要な染色バンドとして検出される 3 種のバンドのうち、最も高分子量の位置で検出されるアディポネクチンである、請求項 1 に記載の測定方法。

【請求項 5】

抗体が、抗アルブミン抗体及び／又は抗アディポネクチン抗体である、請求項 1-4 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 6】

分別して測定する対象が、LMW-Ad である、請求項 1、2 及び 5 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 7】

分別して測定する対象が、LMW-Ad 以外の 2 種である、請求項 1、3-5 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 8】

分別して測定する対象が HMW-Ad であって、分別して測定するための手段が、HMW-Ad 以外の 2 種アディポネクチンにプロテアーゼを作用させることである、請求項 1、4、5 及び 7 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 9】

HMW-Ad の測定に先立って、HMW-Ad 以外の 2 種アディポネクチンにプロテアーゼを作用させる、請求項 1、4、5、7 及び 8 のいずれか 1 項に記載の測定方法。

【請求項 10】

分別して測定する対象が MMW-Ad であって、MMW-Ad 量をアディポネクチン総量から LMW-Ad 量及び HMW-Ad 量の合計量を差し引いて算出する、請求項 1 又は 5 に記載の測定方法。

【請求項 11】

分別して測定する対象が MMW-Ad であって、LMW-Ad をプロテアーゼ処理し、残存する HMW-Ad 量及び MMW-Ad 量の合計量を算出し、該合計量からさらに HMW-Ad 量を差し引くことで算出する、請求項 1 又は 5 に記載の測定方法。

【請求項 12】

下記の 3 種のアディポネクチンのうちの 1 種又は 2 種を、プロテアーゼ及び／又は抗体を使用して、他のアディポネクチンと分別して免疫学的に測定し、その結果を基に、疾病又は病態に関する情報を得ることを特徴とする、疾病又は病態の評価方法。

(1) LMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、150 kDa 以上 200 kDa 以下であり、アルブミンがジスルフィド結合しているアディポネクチン。

(2) MMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、200 kDa 超 400 kDa 未満であるアディポネクチン。

(3) HMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、400 kDa 以上 800 kDa 以下であるアディポネクチン。

【請求項 13】

LMW-Ad、MMW-Ad 及び HMW-Ad のうちの 1 種以上の量の変動により評価を行うものである、請求項 12 に記載の評価方法。

【請求項 14】

LMW-Ad、MMW-Ad 及び HMW-Ad の少なくとも 2 つの量の比を求めて評価を行うものである、請求項 12 に記載の評価方法。

【請求項 15】

他の指標と LMW-Ad、MMW-Ad 及び HMW-Ad のうちの 1 種以上の量、あるいは LMW-Ad、MMW-Ad 及び HMW-Ad の少なくとも 2 つの量の比を関連付けることにより評価を行うものである、請求項 12 に記載の評価方法。

【請求項 16】

疾病又は病態が、2 型糖尿病、動脈硬化性疾患、腎疾患、肝疾患又は肥満症である、請求項 12 に記載の評価方法。

【請求項 17】

2 型糖尿病、動脈硬化性疾患、腎疾患、肝疾患又は肥満症の発症、診断、進展、予知及び治療効果を評価する、請求項 12 に記載の評価方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】多量体アディポネクチンの分別測定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体試料中に含まれる種々の多量体アディポネクチンを分別して免疫学的に測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アディポネクチンは、脂肪細胞から特異的に分泌されるインスリン感受性ホルモンであり、血中に比較的高濃度（ $5 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ ）存在している。アディポネクチンの生理的な作用については、本発明者らにより、アディポネクチンの量的な減少が、肥満による2型糖尿病や脂肪萎縮性糖尿病における糖・脂質代謝異常を引き起こす原因の一つであることが報告され（非特許文献1）、医学的な利用については、糖代謝異常の診断、特にインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の治療効果のモニタリングへの利用（特許文献1）、肝星細胞の活性化及び増殖の抑制、細胞外マトリックス産生の抑制などの作用を利用した肝繊維化抑制剤（特許文献2）が提案されている。

【0003】

アディポネクチンは、構造上C1q（Complement 1q）ファミリーに属し、Cq1ファミリーの特徴であるコラーゲン様ドメインを有していることから、3量体を基本とした多量体を形成して存在していることが報告されている（非特許文献2、3）。

【0004】

アディポネクチンの構造上の相違と生理的作用、活性等との関係に関しては、Tsaoらが、NF- κ Bの活性化作用について、3量体を超える多量体アディポネクチンにのみ活性が認められ、3量体やコラーゲン様ドメインが欠落したグロブラー（globular：球状）ドメインには、活性化作用が認められなかったことを報告している。また、Utpalらは、インスリンやグルコース投与により、高分子画分アディポネクチンのみが有意に低下することや、血糖降下作用は、コラーゲン様ドメインのシステインをセリンに変換したアディポネクチンや還元処理したアディポネクチンで強く、還元未処理及びglobular アディポネクチンではほとんど示さなかったことを報告している（非特許文献4）。

【0005】

しかしながら、これらの報告で検討に使用されたアディポネクチンは、大腸菌等における遺伝子組換えにより発現されたものであり、生体内で分泌されたアディポネクチンの挙動や作用を正確に反映していない可能性が考えられる。また、血中アディポネクチン濃度には性差があることが知られており、女性は男性と比較して有意に高値化している（非特許文献5）ことが報告される一方、マウス血清での成績ではあるが、特に高分子画分アディポネクチンの含量が高いことも報告されている（非特許文献4）。

【0006】

このように、アディポネクチンの構造上の相違と生理的作用や、疾病とアディポネクチンとの関係について、アディポネクチンの総量のみの測定によっては得ることができない情報があるため、生体試料中に存在する種々のアディポネクチン多量体を分別して測定することができる方法が要望されていた。

【0007】

アディポネクチンを測定する方法としては、測定用の試料を予めドデシル硫酸ナトリウム（SDS）存在下に煮沸処理した後、免疫学的に測定をする方法が開示（特許文献3）されている。この方法は立体構造上隠れている、抗体の認識部位を前記処理により露出させて免疫学的にアディポネクチンの総量を測定しようとする方法であり、種々の多量体を分別して測定することはできない。

【0008】

また、測定試料中のアディポネクチンを、SDS変性処理や熱変性処理を行わずに測定する方法（特許文献2では天然型の測定と称している）が開示されている（特許文献2）

が、分別測定に関する記載はなく、利用できるものではない。

【特許文献1】国際公開 WO 03/016906 公報

【特許文献2】特開 2002-363094 公報

【特許文献3】特開 2000-304748 公報

【非特許文献1】Yamauchi T., et al., Nat Med., 7, 941-946, 2001

【非特許文献2】Nakano Y., et al., J. Biochem., 120, 803-812, 1996

【非特許文献3】Tsao T-S., et al., J. Biol. Chem., 277, 29359-29362, 2002

【非特許文献4】Utpal B., et al., J. Biol. Chem., 278, 9073-9085, 2003

【非特許文献5】Yamamoto Y., et al., Clin Sci., 103, 137-142, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、生体試料中で種々の多量体を形成して存在しているアディポネクチンを分別して測定する方法を提供することを目的とし、さらに、分別測定することによりアディポネクチンの総量測定のみでは得られない情報を得、アディポネクチンの生理的作用や、疾病とアディポネクチンとの関係をより正確に評価する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、前記課題を解決するため鋭意研究したところ、血液中のアディポネクチンは、ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量から、150kDa以上200kDa以下（主として160kDa付近）（以下、LMW-Adと表記する。）、200kDa超400kDa未満（主として260kDa付近）（以下、MMW-Adと表記する。）及び400kDa以上800kDa以下（主として450kDa付近）（以下、HMW-Adと表記する。）で区別できる3種が存在することを確認し、さらに検討を続けたところ、LMW-Adが、3量体アディポネクチンにアルブミンがジスルフィド結合したものであること、及び、少なくともアディポネクチンに対する抗体とアルブミンに対する抗体を組合わせて使用することで、LMW-Adを分別測定できることを見出した。

【0011】

また、アディポネクチンが含まれる試料に適当なプロテアーゼを作用させることによって、HMW-Ad以外のアディポネクチンを消化し、プロテアーゼによる消化処理の後、残ったHMW-Adを、抗アディポネクチン抗体を用いて分別測定できることを見出した。

【0012】

さらに、試料中のMMW-Ad量を、アディポネクチン総量からLMW-Ad量及びHMW-Ad量を差し引くことで、算出できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

【0013】

すなわち、本発明は、下記の3種のアディポネクチンのうちの1種又は2種を、プロテアーゼ及び／又は抗体を使用して、他のアディポネクチンと分別して免疫学的に測定することを特徴とする、生体試料中のアディポネクチンの測定方法を提供するものである。

(1) LMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、150kDa以上200kDa以下であり、アルブミンがジスルフィド結合しているアディポネクチン。

(2) MMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、200kDa超400kDa未満のアディポネクチン。

(3) HMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、400kDa以上800kDa以下のアディポネクチン。

【0014】

また本発明は、上記の3種のアディポネクチンのうちの1種又は2種を、プロテアーゼ及び／又は抗体を使用して、他のアディポネクチンと分別して免疫学的に測定し、その結果を基に、疾病又は病態に関する情報を得ることを特徴とする、疾病又は病態の評価方法

を提供するものである。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、LMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Adを分別して測定できることから、アディポネクチンの生理的作用や、疾病又は病態、特に2型糖尿病、動脈硬化性疾患、腎疾患、肝疾患、肥満症の発症、診断、進展、予知及び治療効果をより正確に評価することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明において使用できる生体試料としては、多量体アディポネクチンを含有するものであれば、すべて対象となり、ヒト、サル、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット及びその他の哺乳類の動物から得られた血液、尿などの体液、組織抽出液や組織由来の細胞の培養上清液などが挙げられる。これらのうち、アディポネクチンの生理的作用や、疾病又は病態の正確な評価のための試料としては、血液（血清、血漿）が好適である。試料の採取方法は、分別測定する目的を考慮し、試料中に存在するアディポネクチンに影響を与えない方法であれば使用可能である。例えば、ヒト血液を試料とする場合、評価の目的により、空腹時採血、薬物投与後採血など適宜選択することが好ましい。

【0017】

LMW-Adを分別して免疫測定するための方法について説明する。一つは、LMW-Adを認識する抗体によりLMW-Adを捕捉、検出する方法である。もう一つは、LMW-Adのみを特異的に消化するプロテアーゼをLMW-Adに作用させ、新たに生じたLMW-Ad由来のアディポネクチンの変換物のみを特異的に認識する抗体を用いてLMW-Adを分別測定する方法である。

【0018】

先ず、LMW-Adを認識する抗体によりLMW-Adを捕捉、検出する方法について説明する。当該免疫測定に使用される抗体は、LMW-Adが3量体アディポネクチンとアルブミンとの複合体であることから、当該複合体を認識して捕捉・検出し得るものであれば、特に制限を受けることなく使用できる。このような抗体の好適な例として、アディポネクチンを認識する抗体とアルブミンを認識する抗体の組み合わせ、あるいは、アディポネクチンとアルブミンとの複合体を特異的に認識する抗体が挙げられる。アディポネクチン、アルブミン、アディポネクチンとアルブミンとの複合体をそれぞれ認識するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、公知の手法によって適当な動物に免疫して得ることができる。これらの抗体は、市販品として入手することも可能であり、本発明に使用できる。例えば、抗ヒトアディポネクチン抗体としては、Goat α human Acrp30 antibody（コスモバイオ社、GT社）、rabbit α hu adiponectin-PoAb（コスモバイオ社、chemicon社）、hu Acrp30-MoAb（藤沢薬品工業社、BD社）、Mouse α hu Adiponectin MoAb（コスモバイオ社、chemicon社）、抗ヒトACRP30モノクローナル抗体（AX773、AX741、Ne, Na、和光純薬工業社）などが挙げられる。抗ヒトアルブミン抗体としては、Goat α Albumin, human antibody（コスモバイオ社、BET、ACD、BMD）、Mouse α Albumin, human antibody（コスモバイオ社、NBT、ZYM、MED）、Rabbit α Albumin, human antibody（コスモバイオ社、CL、ACM）、Goat α Albumin, human antibody（フナコシ社、ANT）などが挙げられる。

【0019】

本発明の具体的な免疫学的測定方法としては、ELISA（酵素免疫測定法）、CLEIA（化学発光酵素免疫測定法）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、LTIA（ラテックス免疫比濁法）などの公知の方法を使用することができる。ELISAの場合、例えば、アディポネクチンを認識する抗体を結合させた不溶性担体とアルブミンを認識する抗体を酵素標識抗体として組み合わせる方法、アディポネクチンとアルブミンの複合体を認識する抗体を結合させた不溶性担体によりアディポネクチンとアルブミンの複合体を捕捉し、アディポネクチンを認識する抗体あるいはアルブミンを認識する抗体を酵素標識抗体として組み合わせる方法が挙げられる。測定工程に従ってさらに説明する。アディポネクチンを認識する抗体を結合させた不溶性担体と、アディポネクチンとアルブミンの複合体を含む試料を接触、混合させ

、前記不溶性担体にアディポネクチンとアルブミンの複合体を捕捉する。次いで、酵素標識したアルブミンを認識する抗体を接触、混合することにより、不溶性担体-アディポネクチンとアルブミンの複合体-酵素標識抗体の三元複合体が形成される。この後、酵素と適当な基質を反応させ、その結果生じる反応生成物に由来する吸光度変化を光学的に測定することでアディポネクチンとアルブミンの複合体を定性的または定量的に測定する。LTIAの場合、アディポネクチンとアルブミンの複合体に特異的に結合する抗体を担持させた不溶性担体とアディポネクチンとアルブミンの複合体とを混合することによりアディポネクチンとアルブミンの複合体を介した不溶性担体の架橋（凝集）が起こり、その結果生じる濁りを光学的に測定することでアディポネクチンとアルブミンの複合体を定性的または定量的に測定することができる。LTIAは、アディポネクチンとアルブミンの複合体を簡便、迅速かつ正確に測定するには好適である。

【0020】

本発明に使用される不溶性担体としては、通常の免疫学的測定試薬に使用され工業的に大量生産可能な有機系の不溶性担体を使用される。ELISAにおいては抗体の吸着性に優れかつ生物学的活性を長期間安定的に保持できるポリスチレン等の96穴のマイクロプレートやLTIAにおいてはポリスチレン系のラテックス粒子が好ましい。

【0021】

上記不溶性担体の表面に抗体を担持させる手法は種々知られており、本発明において適宜利用できる。例えば、担持（感作）方法として不溶性担体表面に抗体を物理的に吸着させる方法や、官能基を有する不溶性担体表面に既知の方法である物理結合法や化学結合法により抗体を効率的に感作する方法が挙げられる。

【0022】

抗体を担持させた抗体不溶性担体及び／又は酵素標識抗体とアディポネクチンとアルブミンの複合体との反応は、抗原抗体反応が起こりえる条件であれば、その反応条件は特に限定されない。反応液としては、アディポネクチンとアルブミンの複合体との抗原抗体反応が起こり得る溶液であればどのようなものでも良い。例えば、pHを制御するためのリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等の緩衝成分、非特異反応を回避するための界面活性剤や塩化ナトリウムなど、安定化剤としてのウシ血清アルブミン、ショ糖、高分子多糖類など、反応性を制御する前記物質の他にデキストランなどの水溶性多糖類、酵素の阻害剤等の添加剤を適宜溶解させても良い。

【0023】

ELISAにおける酵素標識抗体は、公知の方法によって調製することができる。例えば、石川らの方法（マレイミド法：「酵素免疫測定法 第3版 医学書院」）等に従い、抗体をそのまま、あるいは必要に応じて抗体を適当なプロテアーゼで限定分解してF(ab')₂又はFab'とした後、酵素で標識することができる。標識に使用する酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。さらに、酵素活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素を用い、発色剤としてo-フェニレンジアミン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン、2, 2'-アジノジー（3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸）アンモニウム塩等、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質として、p-ニトロフェニルフォスフェート等、酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質として、 β -D-ガラクトピラノシド等、酵素にグルコースオキシダーゼを用いる場合はペルオキシダーゼの共存下で基質として、 β -D-グルコース、発色剤としてペルオキシダーゼで使用了発色剤等を用いることができる。

【0024】

ELISAにおける酵素標識抗体の酵素活性に由来する基質と酵素の反応生成物を測定する方法は特に限定されない。例えば、酵素がペルオキシダーゼ、基質が過酸化水素、発色剤がo-フェニレンジアミンの場合、酵素反応生成物固有の波長、492nmにおける吸光度として96穴マイクロプレートリーダーで読み取ることが可能である。

【0025】

LTIAにおける不溶性担体の凝集程度を測定する方法は特に限定されない。例えば、凝集を定性的ないし半定量的に測定する場合は、既知濃度試料の濁度程度と測定試料の濁度程度との比較から、凝集の程度を目視によって判定することも可能である。また、該凝集を定量的に測定する場合は、簡便性及び精度の点からは、光学的に測定することが好ましい。凝集の光学的測定法としては、公知の方法が利用可能である。より具体的には、例えば、いわゆる比濁法（凝集塊の形成を濁度の増加として捕らえる）、粒度分布による測定法（凝集塊の形成を粒度分布ないしは平均粒径の変化として捕らえる）、積分球濁度法（凝集塊の形成による前方散乱光の変化を積分球を用いて測定し、透過光強度との比を比較する）などの種々の方式が利用可能である。

【0026】

次に、もう一つの方法であるLMW-Adのみを特異的に消化するプロテアーゼをLMW-Adに作用させ、新たに生じたLMW-Ad由来のアディポネクチンの変換物のみを特異的に認識する抗体を用いてLMW-Adを分別測定する方法について説明する。この方法で使用されるプロテアーゼとしては、LMW-Adを特異的に消化し、一定形態の変換物を生成させる作用があるものであれば制限なく使用することができる。プロテアーゼの起源も、微生物由来、動物由来、植物由来など、特に制限はないが、好適には、アスペルギルス属等の微生物由来のプロテアーゼが使用される。アスペルギルス属由来のプロテアーゼの市販品の例として、プロテアーゼA「アマノ」（アマノエンザイム社）、スミチームFP、スミチームLP50D（新日本化学工業社）などが挙げられる。これらプロテアーゼは遺伝子組み換え技術によって得たものであっても差し支えない。また化学修飾を施されていても良い。新たに生じたLMW-Ad由来のアディポネクチンの変換物のみを特異的に認識する抗体は、公知の手法によって適当な動物に免疫し得ることができる。さらに、前述したLMW-Adを認識する抗体によりLMW-Adを捕捉、検出する方法についての記載を参考に、ELISAやLTIAが実施できる。

【0027】

HMW-Adを分別して免疫測定するための方法について説明する。アディポネクチンが含まれる試料に適当なプロテアーゼを作用させ、HMW-Ad以外のアディポネクチンを消化し、プロテアーゼによる消化処理の後、残ったHMW-Adを、抗アディポネクチン抗体を用いて測定する。HMW-Adを分別測定するのに使用されるプロテアーゼとしては、HMW-Adを消化せず、それ以外のアディポネクチンを消化するものであればいずれも制限することなく使用することができる。プロテアーゼの起源も、微生物由来、動物由来、植物由来など、特に制限はないが、好適には、アスペルギルス属等の微生物由来のプロテアーゼが使用される。アスペルギルス属由来のプロテアーゼの市販品の例として、プロテアーゼP「アマノ」、ウマミザイム（いずれもアマノエンザイム社）、スミチームMP（新日本化学工業社）などが挙げられる。これらプロテアーゼは遺伝子組換え技術により得られたものであっても差し支えない。また化学修飾を施されていてもよい。

【0028】

生体試料をこれらのプロテアーゼで処理し、残存するHMW-Adを測定するための抗体としてはアディポネクチンを認識する抗体を使用することができる。抗アディポネクチンポリクローナル抗体やモノクローナル抗体は、公知の手法によって適当な動物に免疫し得ることができるが、市販品として入手することも可能であり、本発明に使用できる。例えば、抗ヒトアディポネクチン抗体は、Goat α human Acrp30 antibody（コスモバイオ社、GT社）、rabbit α hu adiponectin-PoAb（コスモバイオ社、chemicon社）、hu Acrp30-MoAb（藤沢薬品工業社、BD社）、Mouse α hu Adiponectin MoAb（コスモバイオ社、chemicon社）、抗ヒトACRP30モノクローナル抗体（AX773、AX741、Ne,Na、和光純薬工業社）などが挙げられる。また、市販のアディポネクチン総量を測定するキットも使用することが出来、例えば、「ヒトアディポネクチンELISAキット」（大塚製薬社）等が挙げられる。

【0029】

また、上記に挙げたプロテアーゼは、HMW-Ad以外を消化するに際して、一定形態の変換物を生成させる作用を有しており、その変換物を測定することで、LMW-AdとMMW-Adの合計

量が算出され、さらに、アディポネクチン総量から差し引くことで、HMW-Adの量を算出することも可能である。新たに生成したLMW-AdとMMW-Ad由来のアディポネクチンの変換物のみを特異的に認識する抗体は、公知の手法によって、適当な動物に免疫し、得ることができる。

【0030】

ここで、生体試料のプロテアーゼ処理は、用いるプロテアーゼによって異なるが、リン酸、トリス、グッド等の緩衝液中、4～60℃で5分～24時間行うことが好ましい。前述したLMW-Adを分別測定する方法についての記載を参考に、ELISAやLTIAが実施できる。

【0031】

MMW-Adを分別して免疫測定するための方法について説明する。MMW-Adの分別測定は、試料中のアディポネクチン総量から、LMW-Ad及びHMW-Adの含量を差し引くことで求めることができる。アディポネクチン総量は、市販のアディポネクチン総量を測定するキットも使用することができるほか、生体試料を、還元剤、酸又はその塩及びプロテアーゼの内の少なくともひとつをアディポネクチンに作用させ、多量体アディポネクチンを一定の形態に変換させて免疫学的に測定する本発明者らの開発した方法（特願2003-354715）も利用できる。

【0032】

またさらに、LMW-Adのみを特異的に消化するプロテアーゼを作用させ、消化されずに残存するMMW-Ad及びHMW-Adの総量を求め、その総量からHMW-Ad量を差し引くことで、算出することが可能である。この方法で使用されるプロテアーゼとしては、LMW-Adのみを特異的に消化できるものであればいずれも制限することなく使用することができる。プロテアーゼの起源も、微生物由来、動物由来、植物由来など、特に制限はないが、好適には、バチルス属、アスペルギルス属、スタフィロコッカス属等の微生物由来のプロテアーゼが使用され、例えば、プロテアーゼS「アマノ」、プロテアーゼA「アマノ」（いずれもアマノエンザイム社）、スミチームFP、スミチームLP50D（新日本化学工業社）、プロテアーゼV8（生化学工業社）などの市販されているものも利用できる。これらのプロテアーゼは、遺伝子組換え技術により得られたものでもよい。また化学修飾を施したものでもよい。残存するMMW-Ad及びHMW-Adの総量は、市販のアディポネクチン総量を測定するキット等を使用することで求められる。差し引くHMW-Ad含量は、上記に挙げた方法により測定できる。

【0033】

さらにまた、LMW-Ad及びMMW-Adの総量を、先に述べたプロテアーゼを用いて、変換物の総量として算出し、この量から、先に述べたLMW-Adを分別する方法を用いて算出される量を差し引くことで、MMW-Adの量を算出することも可能である。前述したLMW-AdあるいはHMW-Adを分別測定する方法についての記載を参考に、ELISAやLTIAが実施できる。

【0034】

本発明によれば、ヒト血液中に存在する3種のヒトアディポネクチンが各々分別して測定できる。その結果、2型糖尿病、動脈硬化性疾患、腎疾患、肝疾患、肥満症の発症、診断、進展、予知及び治療効果が評価可能となる。評価の方法としては、LMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Adのうちの1種以上の量の変動あるいはLMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Adの少なくとも2つの量の比を基準値を設けて観察する方法、同一個体における経時的な変動を観察する方法が挙げられる。さらに特定の疾病や病態において公知の他の指標（例えば、2型糖尿病におけるインスリン、動脈硬化性疾患におけるHDLコレステロールなど）とLMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Adのうちの1種以上の量、あるいはLMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Adの少なくとも2つの量の比を関連付けることにより評価を行う方法も挙げることができる。

【実施例】

【0035】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

【0036】

<試薬及び材料>

実施例及び参考例で用いた試薬及び材料は以下の通りである。

- a. 抗体結合樹脂用洗浄液: 0.5 M NaCl を含む 0.1 M NaHCO₃-NaOH (pH 8.3)。
- b. 抗体結合樹脂用溶出液: 0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5)。
- c. 抗体結合樹脂用中和液: 2 M Tris-HCl (pH 8.0)。
- d. ELISA用プレート: 96穴マイクロプレート (NUNC社)。
- e. ELISA用抗体感作溶液: PBS (pH 7.4)。
- f. ELISA用緩衝液: 1% ウシ血清アルブミン、0.1% Tween 20 を含む PBS (pH 7.4)。
- g. Vector ABC kit (Mouse): フナコシ社、Cat No. PK-6102。
- h. DAB基質キット (ウエスタンプロテイング発色基質): フナコシ社、Cat No. SK-4100。
- i. 抗ヒトアディポネクチンモノクローナル抗体 (hu Acrp30-MoAb): 藤沢薬品工業社、BD Transduction Laboratories社、商品コード A12820。
- j. ヤギ抗ヒトアディポネクチンポリクローナル抗体 (Goat α human Acrp30 antibody): コスモバイオ社、GT社、Cat No. 421065。
- k. ヤギ抗マウス IgG HRP 標識抗体: コスモバイオ社、capple社。

【0037】

参考例1 大腸菌リコンビナント マウスグロブラーアディポネクチン (rMgAd) の調製
マウスアディポネクチンの遺伝子配列 (NCBI accession #U37222) のグロブレードメイン配列 (104-247 残基相当) を 6×His タグを含む pQE 30 ベクターの BamHI、HindIII に挿入し、大腸菌に組み込んだ。リコンビナント マウスグロブラーアディポネクチン (rMgAd) を発現した大腸菌からの rMgAd の精製は、以下の操作により行った。すなわち、大腸菌の可溶画分を Ni-NTA アガロース (QIAGEN 社) に 4℃、16 時間添加して rMgAd を結合させた後、イミダゾールにより段階的に溶出させ、アディポネクチンを含む画分を回収し、3 日間 PBS (pH 7.4) で透析を行なった。得られた rMgAd の蛋白質濃度は、Bio-Rad DC protein assay kit を用いて求めた。

【0038】

参考例2 抗rMgAd抗体の作製

参考例1で調製した rMgAd の 50 μ g を等量のフロイドのコンプリートアジュバントと混合して、2 匹のウサギに 2 週間おきに 6 回免疫して抗血清を作製した。抗血清中の特異抗体 (IgG) の精製は、Protein A 樹脂を用いて常法により行なった。

【0039】

参考例3 ヒト血清アディポネクチン (hsAd) の精製

参考例2で作製した抗rMgAd抗体 500mg を CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Bioscience 社) 50mL に結合させ抗rMgAd抗体結合 Sepharose 4B 樹脂を作製した。ヒト血清 2.5L を抗rMgAd抗体結合 Sepharose 4B 樹脂に添加し、抗体結合樹脂用洗浄液で十分洗浄した後、抗体結合樹脂用溶出液でヒト血清アディポネクチン (hsAd) 画分を溶出し、溶出画分に抗体結合樹脂用中和液を 1/10 量添加して中和した。さらに、中和した溶出画分を、Protein A 樹脂に添加し、Protein A 樹脂への非吸着画分を精製 hsAd として回収し、「ヒトアディポネクチン ELISA キット」 (大塚製薬社) によりアディポネクチン含量を測定した。

【0040】

実施例1 ヒト血清中の多量体アディポネクチンの分別精製

参考例3で得た精製 hsAd を、20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて透析して脱塩した後、これを Gelatin-Cellulofine (生化学工業社) カラムに吸着させ、0、100、200、300 及び 500mM の NaCl をそれぞれ含む 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて、段階的に溶出させた。得られた各 NaCl 濃度の溶出画分中には、分子量の異なるアディポネクチンが混在していた。得られた各溶出画分を濃縮し、それぞれの溶出画分について Sephacryl S-300 (分画分子量; 10~1500kDa、平均粒子径 47 μ m、Amersham Bioscience 社) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーをさらに実施した。溶離液には、150mM の NaCl

を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用した。Sephacryl S-300 カラムの分子量較正は Gel filtration calibration Kit (Amersham Bioscience 社) を用いて行った。各クロマトグラフィーにおけるアディポネクチンの検出は、「ヒトアディポネクチン ELISA キット」(大塚製薬社) により行った。

【0041】

ゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムを図 1 に示した。得られた溶出フラクションを、150 kDa 以上 200 kDa 以下 (主として 160 kDa 付近)、200 kDa 超 400 kDa 未満 (主として 260 kDa 付近)、400 kDa 以上 800 kDa 以下 (主として 450 kDa 付近) の 3 画分に区別して収集し、多量体アディポネクチン分別精製品とした。なお、各多量体アディポネクチン分別精製品は、150 kDa 以上 200 kDa 以下 (主として 160 kDa 付近) のものを LMW-Ad、200 kDa 超 400 kDa 未満 (主として 260 kDa 付近) のものを MMW-Ad、400 kDa 以上 800 kDa 以下 (主として 450 kDa 付近) のものを HMW-Ad と呼ぶこととした。

【0042】

前工程で得られた 3 種の多量体アディポネクチン分別精製品、LMW-Ad、MMW-Ad 及び HMW-Ad それぞれを、ポリアクリルアミド電気泳動 (アクリルアミド濃度 2-15%) (以下、PAGE (2-15%)) のように表記する) にて分離し、CBB 蛋白染色を行なった。染色した泳動像を図 2 に示した。

【0043】

LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad、いずれについても主たる染色バンド以外のバンドが認められたが、主たる染色バンドに対して検出の程度は僅かであり、分別、精製が達成されていることが確認された。なお、前述したとおりアディポネクチンは、3 量体を基本として多量体を形成しているため、LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad のいずれについても、PAGE で見積もられる分子量とゲルろ過での分子量は必ずしも一致していない。

【0044】

実施例 2 ヒト由来の多量体アディポネクチン (LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad) の構造解析

1) SDS-PAGE による解析

実施例 1 で得られた多量体アディポネクチン分別精製品を、非還元条件で SDS-PAGE (2-15%) にて分離し、CBB 蛋白染色を行なった。染色した泳動像を図 3 に示した。

【0045】

LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-Ad とともに 60 kDa 付近に、明確な染色バンドが認められた。当該染色バンドは、報告されているアディポネクチンの構造及び分子量から、2 量体のアディポネクチンと推定された。LMW-Ad については、前記 60 kDa 以外に、90 kDa 付近に、未同定の明確な染色バンドが認められた。

【0046】

2) SDS-PAGE (2-15%) で 90 kDa 付近に泳動される未同定アディポネクチンの分析

前記 1) で検出された 90 kDa 付近の未同定染色バンドのゲルを切り出し、エレクトロエリユーター Model 422 (バイオラッド社) を用いて蛋白を抽出した。抽出された蛋白を 2-メルカプトエタノールを含む処理液により煮沸、還元処理し、再度 SDS-PAGE (2-15%) にて分離後、PVDF 膜へ転写し、CBB 蛋白染色を行なったところ、60 kDa 付近と 30 kDa 付近に 2 本の染色バンドが確認された。

【0047】

前記 60 kDa 付近及び 30 kDa のバンド中の蛋白それぞれについて、N 末端アミノ酸配列を分析したところ、60 kDa 付近のバンド中の蛋白の N 末端アミノ酸配列は、ヒトアルブミンの N 末端アミノ酸配列と一致した。一方、30 kDa 付近のバンド中の蛋白の N 末端アミノ酸配列は、アディポネクチンのアミノ酸配列の 19 番目からの配列と一致した。

【0048】

以上の事実より、LMW-Ad を SDS-PAGE (2-15%) した際に検出される 90 kDa 付近の蛋白は、アルブミン 1 分子とアディポネクチン 1 分子がジスルフィド結合したヘテロダイマーであることが判明した。従って、LMW-Ad 画分のアディポネクチンの構造は、3 量体ア

ディボネクチンとアルブミンがジスルフィド結合した構造を有していることが判明した。

【0049】

実施例3 ヒト血清中のアディポネクチンのウェスタンブロッティング解析

健常者8名の血清0.2 μ L分を、PAGE (2-15%) にて分離し、セミドライブロッティングによりPVDF膜に転写後、免疫染色を行なった。手順は、転写膜を5%スキムミルク及び0.1%Na₂S₂O₃を含むPBS液 (pH7.4) でブロッッキング後、0.1%Tween 20を含むPBS液 (pH7.4) で洗浄し、抗アディポネクチンモノクローナル抗体 (hu Acrp30-MoAb; 藤沢薬品工業社、BD Transduction Laboratories社) 1 μ g/mLを室温で1時間反応させた。0.1%Tween 20を含むPBS液 (pH7.4) で十分に洗浄した後、Vector ABC kit (Mouse) 及びDAB基質キット (フナコシ社) を用いて発色させた。

【0050】

実施例1で調製したLMW-Ad、MMW-Ad及びHMW-Ad画分と同じ位置にメインバンドとして発色を認めたことから、この3種のアディポネクチンが血中に存在する主なものであることが判明した (図4)。

【0051】

実施例4 アルブミン結合型アディポネクチンの測定

ELISA用プレートにGoat α human Acrp30 antibodyをELISA用抗体感作溶液で1 μ g/mLに希釈した後、感作した。ELISA用緩衝液でブロッッキング後、LMW-AdをELISA用緩衝液で1、0.1、0.01 μ g/mL (Ad含量として) の濃度に希釈し室温で1時間反応させた。ELISA用緩衝液でプレートを洗浄後、ELISA用緩衝液で1/2000倍希釈した抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 (特開2001-337092) 液を室温で1時間反応させた後、ELISA用緩衝液でプレートを洗浄、ELISA用緩衝液で1/1000倍希釈したGoat α mouse IgG HRP標識抗体液を室温で1時間反応させた。ELISA用緩衝液でプレートを洗浄後、TMB (テトラメチルベンチジン) と過酸化水素の基質を用いたHRPの酵素反応により発色させ、2N硫酸を添加して反応を停止させた後、450nmの吸収を測定した。測定結果を図5に示す。

【0052】

濃度依存的な吸光度の増加が観察され、サンドイッチ免疫測定法が成立したことより、LMW-Adは、アディポネクチンにアルブミンが結合したもの (アルブミン結合型アディポネクチン) であることがわかった。また、本実施例の方法によりLMW-Adを分別測定できることもわかった。

【0053】

実施例5 プロテアーゼ処理

50mMリン酸緩衝液 (pH8.0) に、純化した多量体アディポネクチン及び各種市販プロテアーゼを添加し、37℃で60分間加温した。その処理液をPAGE (2-15%) にて分離し、プロテアーゼ非添加試料を対照として、各画分への作用を、CBB蛋白染色像にて比較した (表1)。

【0054】

プロテアーゼ非添加試料の処理条件1~2に使用のプロテアーゼ処理では、LMW-Ad画分は消失するが、MMW-Ad及びHMW-Adは残存することが確認された。さらに、明確な変換物は確認されなかった。一方、処理条件3~4に使用のプロテアーゼ処理では、LMW-Adは消失し、MMW-Ad画分及びHMW-Adは残存することが確認され、さらに、低分子量領域にLMW-Ad由来の変換物である新たな染色バンドの出現が確認された。さらに、処理条件5~6に使用のプロテアーゼ処理では、LMW-Ad及びMMW-Ad画分は消失し、HMW-Adは残存することが確認され、さらに、低分子量領域にLMW-Ad由来の変換物である新たな染色バンドの出現が確認された。これら変換物のPAGE (2-15%) での染色バンドの検出位置は、用いるプロテアーゼにより、若干異なる場合があるものの、30-42kDaの範囲で検出された。この結果より、処理条件1及び2での処理により、MMW-Ad及びHMW-Adの総量、処理条件3及び4での処理により、LMW-Adのみ又はMMW-Ad及びHMW-Adの総量、処理条件5及び6での処理により、HMW-Adのみ又はMMW-Ad及びHMW-Adの総量を測定可能となることがわかった。

【0055】

【表1】

処理条件		1	2	3	4	5	6
プロテアーゼ		プロテアーゼS 「アミノ」	プロテアーゼ V8	プロテアーゼA 「アミノ」	スミチームFP	プロテアーゼP 「アミノ」	ウミサイルム
多量体アディ ポネクチン	HMW-Ad	+	+	+	+	+	+
	MMW-Ad	+	+	+	+	-	-
	LMW-Ad	-	-	-	-	-	-
変換物		-	-	+	+	+	+

(-) = 消失、(+) = 不変又は変換物の生成を示す。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】多量体アディポネクチンのゲルろ過クロマトグラムである。

【図2】LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-AdをそれぞれPAGE（2-15%）し、CBB蛋白染色した、泳動像の図である。

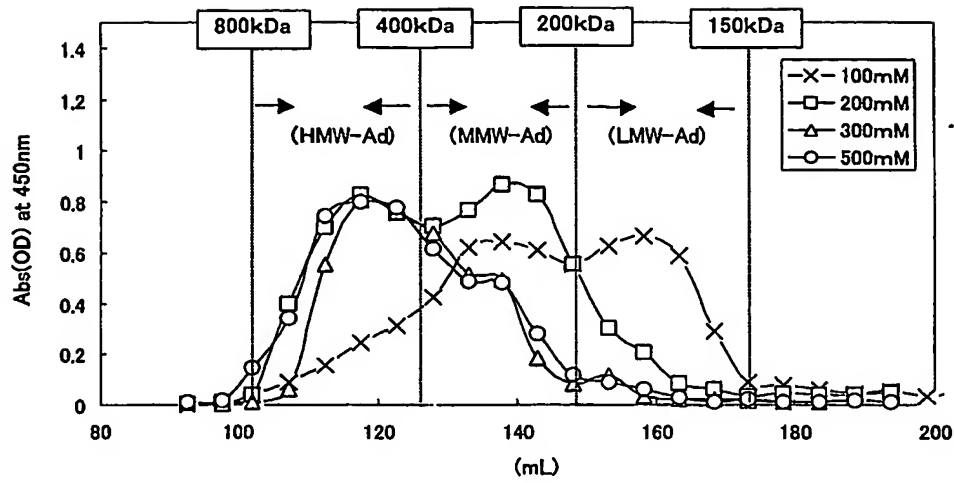
【図3】LMW-Ad、MMW-Ad、HMW-AdをそれぞれSDS-PAGE（2-15%）し、CBB蛋白染色した、泳動像の図である。

【図4】ヒト血清中のアディポネクチンを、ウェスタンブロッティング法により解析した図である。

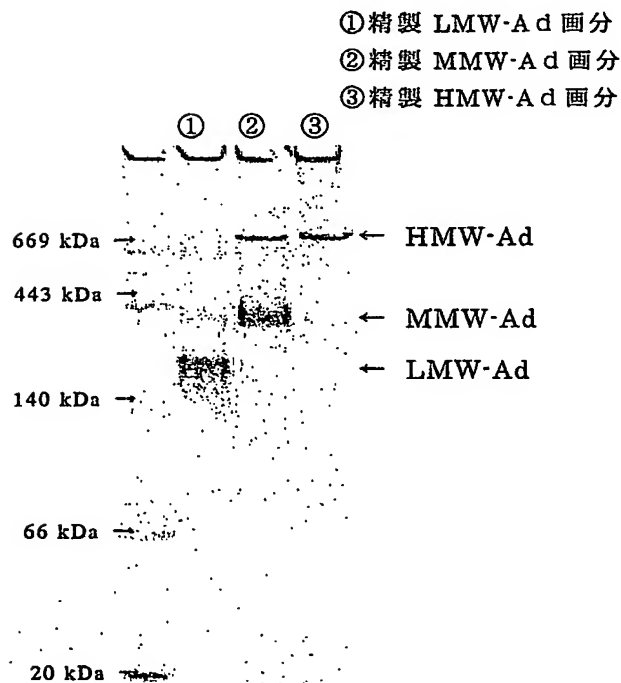
【図5】LMW-Ad（アルブミン結合型アディポネクチン）を免疫測定法により測定した結果を示す図である。

【書類名】 図面

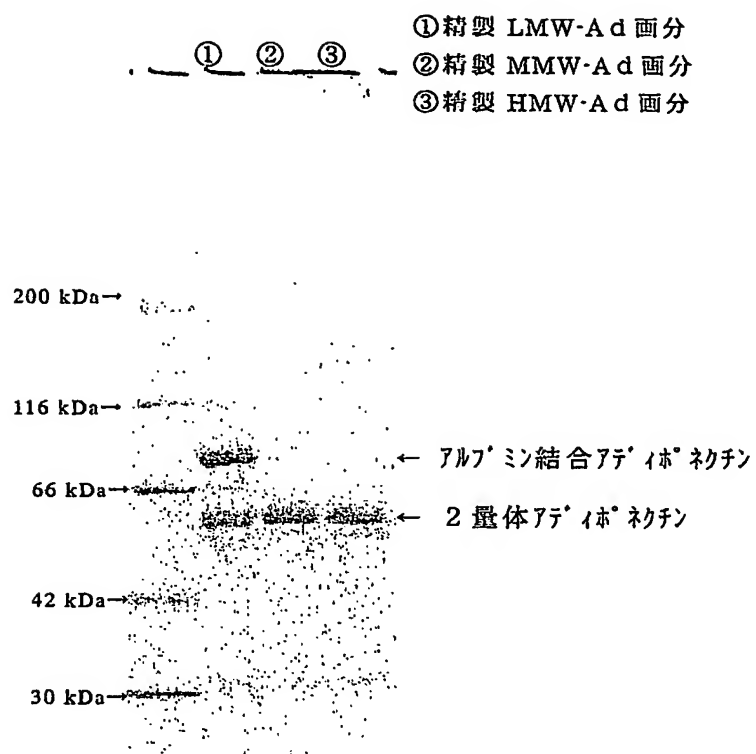
【図 1】



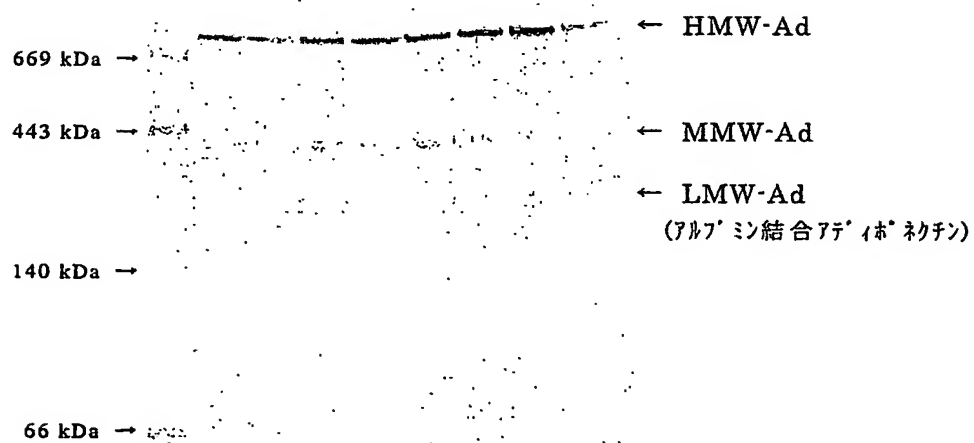
【図 2】



【図 3】

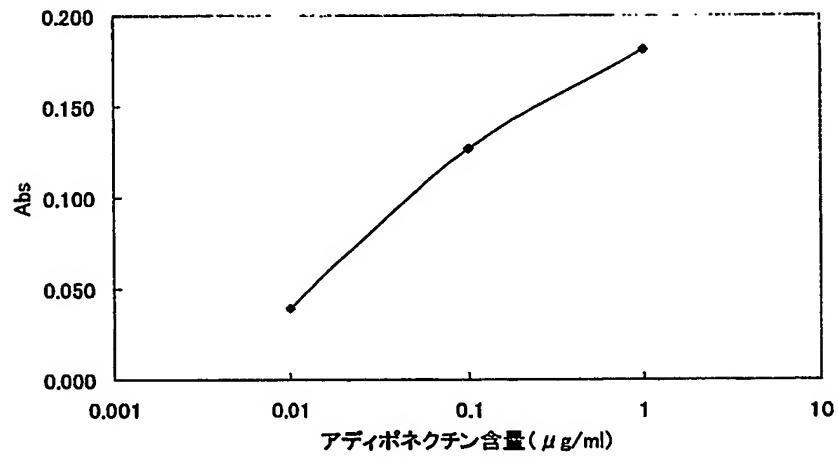


【図 4】



【図 5】

アルブミン結合型アディポネクチンの測定



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 生体試料中で種々の多量体を形成して存在しているアディポネクチンを分別して免疫学的に測定する方法の提供、さらに、分別測定することによりアディポネクチンの総量測定のみでは得られない情報を得、疾病とアディポネクチンの関係をより正確に評価する方法を提供する。

【解決手段】 下記の3種のアディポネクチンのうちの1種又は2種を、プロテアーゼ及び／又は抗体を使用して、他のアディポネクチンと分別して免疫学的に測定することの特徴とする、生体試料中のアディポネクチンの測定方法。

(1) LMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、150 kDa以上200 kDa以下であり、アルブミンがジスルフィド結合しているアディポネクチン。

(2) MMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、200 kDa超400 kDa未満であるアディポネクチン。

(3) HMW-Ad: ゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もられる分子量が、400 kDa以上800 kDa以下であるアディポネクチン。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-354930
受付番号	50301711623
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成15年10月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年10月15日

【書類名】 出願人名義変更届
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-354930
【承継人】
【識別番号】 899000024
【氏名又は名称】 株式会社東京大学 T L O
【承継人代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 高野 登志雄
【承継人代理人】
【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸
【承継人代理人】
【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄
【承継人代理人】
【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫
【承継人代理人】
【識別番号】 100117156
【弁理士】
【氏名又は名称】 村田 正樹
【承継人代理人】
【識別番号】 100111028
【弁理士】
【氏名又は名称】 山本 博人
【承継人代理人】
【識別番号】 100089048
【弁理士】
【氏名又は名称】 浅野 康隆
【承継人代理人】
【識別番号】 100101317
【弁理士】
【氏名又は名称】 的場 ひろみ
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 164232
【納付金額】 4,200円
【提出物件の目録】
【物件名】 委任状 1
【援用の表示】 平成 1 6 年 5 月 2 6 日付け提出の包括委任状

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-354930
受付番号	50401116545
書類名	出願人名義変更届
担当官	小野塚 芳雄 6590
作成日	平成16年 8月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 7月 2日
【承継人】	
【識別番号】	899000024
【住所又は居所】	東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号
【氏名又は名称】	株式会社東京大学 T L O
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	110000084
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル
【氏名又は名称】	特許業務法人アルガ特許事務所
【承継人代理人】	
【識別番号】	100068700
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】	有賀 三幸
【承継人代理人】	
【識別番号】	100077562
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】	高野 登志雄
【承継人代理人】	
【識別番号】	100096736
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】	中嶋 俊夫
【承継人代理人】	
【識別番号】	100117156
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所

【氏名又は名称】 村田 正樹
【承継人代理人】
【識別番号】 100111028
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同
ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】 山本 博人
【承継人代理人】
【識別番号】 100089048
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同
ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】 浅野 康隆
【承継人代理人】
【識別番号】 100101317
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同
ビル 特許業務法人 アルガ特許事務所
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

特願 2003-354930

出願人履歴情報

識別番号

[390037327]

1. 変更年月日

1990年12月12日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

氏名

第一化学薬品株式会社

特願 2003-354930

出願人履歴情報

識別番号

[503181716]

1. 変更年月日

2003年 5月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県川崎市麻生区片平3-16-14

氏 名

門脇 孝

特願 2 0 0 3 - 3 5 4 9 3 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 9 9 0 0 0 0 2 4]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 9 月 1 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区丸の内一丁目 5 番 1 号 新丸の内ビルディング 6 階

氏 名

株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター

2. 変更年月日

2 0 0 4 年 5 月 1 0 日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号

氏 名

株式会社東京大学 T L O